

0-734011-|

На правах рукописи

ТРУШИН Максим Викторович

**РОЛЬ ВИДИМОГО И ИНФРАКРАСНОГО СВЕТА
В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА *ESCHERICHIA COLI***

03.00.07 - микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань 2003



Работа выполнена в Казанском институте биохимии и биофизики КНЦ РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук,
Чернов В. М.

Научный консультант: доктор биологических наук,
Чернова О. А.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор Ильинская О. Н.
кандидат биологических наук,
Николасв Ю. А.

Ведущая организация: Институт биофизики клетки РАН,
г. Пущино

Защита состоится «15» мая 2003 г. в 14³⁰ часов на заседании
Диссертационного Совета Д.212.081.08 при Казанском государственном уни-
верситете им. В.И. Ульянова-Ленина, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственно-
го университета

Автореферат разослан «4» апреля 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

к.б.н., доцент

Аскарлова

Аскарова А. Н.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Все живое на Земле постоянно испытывает влияние различных факторов внешней среды: света, температуры, влажности, гравитационного поля, природного радиоактивного фона и т.д. Очевидно каждый из этих факторов сыграл определенную роль в эволюции, в процессе которой земные организмы приспособились к их влиянию и выработали по отношению к ним защитные механизмы. Исследования последних десятилетий свидетельствуют о высокой чувствительности биологических объектов к воздействию света. Сравнительно недавно появились данные о возможном принципиальном значении всего спектра света (от ультрафиолетовой области до инфракрасной) для регуляции клеточных процессов у организмов в микро- и макробиоценозах (Popp, 1992). Особый интерес представляют концепции, рассматривающие свет как фактор, который может оказывать влияние на внутри- и межклеточную коммуникацию, клеточный рост и дифференцировку (Albrecht-Buehler, 1992; Popp, 2002). Предполагается, что свет вовлечен в информационные взаимодействия между микроорганизмами (Николаев, 1992, 2000). В связи с этим выяснение роли света в регуляции биосистем является в настоящее время актуальной проблемой

Достигнуты значительные успехи в выяснении влияния света на различные аспекты жизнедеятельности биоты; активно обсуждаются возможные механизмы его действия (Кару, 2001). Вместе с тем, данных об одновременном влиянии ди- и полихроматического света на клетки бактерий пока мало. При этом ответные реакции бактерий на свет в условиях воздействия различных факторов практически не исследованы. Еще менее изученной является роль света в осуществлении дистантной регуляции различных процессов жизнедеятельности микроорганизмов, в том числе роста бактерий.

Цель настоящей работы заключалась в выяснении влияния света видимого и инфракрасного диапазона на рост и дистантное взаимодействие бактерий *Escherichia coli*. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать влияние широкого диапазона доз красного и инфракрасного излучения на штаммы *E. coli*, растущие на богатой (JIB) и синтетической (M9) питательной среде.
2. Установить влияние предварительной обработки клеток *E. coli* хлористым кальцием на характер ответа бактериальной культуры на облучение.
3. Выявить особенности дистантной регуляции роста бактериальных культур при индуцированных изменениях физиологического состояния излучательной культуры.
4. Охарактеризовать световую эмиссию бактериальной культуры *E. coli* и ее изменения в процессе культивирования.
5. Определить взаимовлияние двух растущих бактериальных культур на основе их эмиссионных характеристик.

Научная новизна. В настоящей работе впервые исследовано влияние одновременного воздействия красного и инфракрасного света широкого диапазона доз на рост *E. coli* AD494(DE3)pLysS и MC1061. Показано, что эффект стимуляции роста бактерий вследствие облучения зависит как от состава среды культивирования, так и от генетических особенностей штаммов *E. coli*. Исследовано влияние красного и инфракрасного излучения на клетки, подвергнутые действию различных факторов, обуславливающих биохимические и генетические модификации микроорганизмов.

Получены результаты, свидетельствующие о роли различных факторов (тип питательной среды, плотность культуры, обработка антибиотиком, предварительное облучение одной культуры красным и инфракрасным светом) в проявлении феномена дистантных взаимодействий бактерий.

Впервые выявлена зависимость между ростом и характером эмиссии света клеток *E. coli* при дистантном взаимодействии культур.

Практическая значимость. Данные о значении различных факторов для проявления эффектов биостимуляции могут быть использованы при составле-

нии прогноза эффективности терапевтического применения красного и инфракрасного света.

Метод измерения эмиссии света организмов может быть важным дополнением к аналитическим биологическим способам оценки физиологического состояния биосистем.

Выполненные исследования позволяют рассматривать электромагнитное излучение оптического и инфракрасного диапазона в качестве возможного канала информации живых систем.

Полученные результаты о характере дистантных взаимодействий между бактериальными клетками вносят вклад в развитие представлений о роли света в регуляции роста бактерий.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на X международном симпозиуме «Лазерная физика - 2001» (Москва, 2001); II международной конференции «Космос и биосфера. Физические поля в биологии, медицине, экологии» (Партенит, Украина, 2001); IV научно-практической конференции молодых ученых и специалистов республики Татарстан (Казань, 2001); VI конференции молодых ученых «Биология - наука 21 века» (Пушино, 2002); III международном симпозиуме «Будущее кишечной микробиологии» (Абердин, Великобритания, 2002); VI всероссийском популяционном семинаре «Фундаментальные и прикладные проблемы популяционной биологии» (Нижний Тагил, 2002); III международном симпозиуме «Механизмы действия сверхмалых доз» (Москва, 2002).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ.

Структура и объем работы. Диссертация включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, выводы, список цитируемой литературы, приложение. Работа изложена на 112 страницах машинописного текста, содержит 29 таблиц (из них 12 – в основной части, 17 – в приложении), 11 рисунков. Список цитируемой литературы включает 149 источников, из них 100 - зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы штаммы *E. coli* AD494(DE3)pLysS ($\Delta ara^- leu7967 \Delta lacX74 \Delta phoAPvuII phoR \Delta malF3 F'[lac^+ (lacI^q)pro] trxB::kan$ (DE3), (Cm^R)) и MC1061 ($\Delta ara^- leu7967 \Delta lacX74 galK strA hsdR$). Данные штаммы культивировали на питательных средах М9 и ЛБ (Методы генетической инженерии, 1984).

Клетки *E. coli* готовили и облучали красным и инфракрасным светом (660 и 900 нм) по (Karu *et al.*, 1988). В качестве источника излучения использовали лечебный светодиодный матричный аппарат для фототерапии (Томск, Россия).

Эксперименты по исследованию дистантных взаимодействий были проведены в установке «колба-в-колбе» (Николаев, 1992), а также в специально изготовленной установке со спаянными сосудами (в дальнейшем – «УСС»), представленной на рис. 1

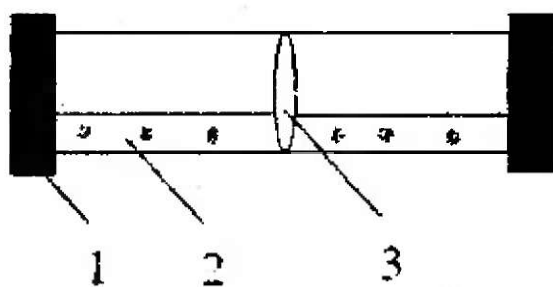


Рис. 1. Экспериментальная установка для изучения дистантных взаимодействий бактерий («УСС»). Цифрами обозначены: 1 - закручивающиеся пробки, 2 - культуры бактерий, 3 - место спайки донышек сосудов.

За ростом клеток следили по величине светорассеяния, измеряемой при 590 нм на фотоэлектроколориметре КФК-3. Основные показатели роста (длительность лаг-фазы, удельная скорость роста, время удвоения и урожай) были вычислены по уравнениям (Шлегель, 1987).

Генетическую трансформацию с применением хлористого кальция и белковый электрофорез в 12 % полиакриламидном геле проводили с использованием стандартных методик (Методы генетической инженерии, 1984; Allen, Mauger, 1974).

Регистрацию излучений бактерий проводили на установке, включающей в себя монохроматор, фотоэлектронный умножитель, работающий в режиме

счета фотонов, амплитудный дискриминатор, формирователь импульсов, измерительно-вычислительный комплекс и компьютер.

Для оценки достоверности полученных результатов использовали критерий Стьюдента с учетом нормальности распределения соответствующих величин. Для проверки нормальности распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Для вычисления статистических критериев, средних арифметических значений и стандартных отклонений использовали компьютерные программы Statistica (версия 5.0) и Origin (версия 6.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние широкого диапазона доз красного и инфракрасного света на рост бактерий *E. coli*

При исследовании влияния широкого диапазона доз красного и инфракрасного излучения (от 1 до 10 кДж/м²) на рост штаммов *E. coli* AD494(DE3)pLysS и MC1061 были обнаружены следующие особенности его действия. Для обоих штаммов не было зафиксировано достоверных различий в

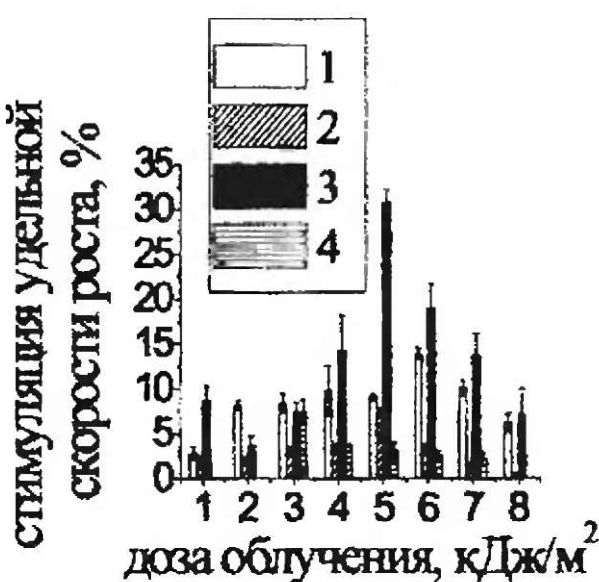


Рис. 2. Диаграмма особенностей стимуляции удельной скорости роста штаммов *E. coli* в зависимости от дозы излучения. Обозначения: 1 - MC1061, среда M9; 2 - MC1061, среда ЛБ; 3 - AD494(DE3)pLysS, среда M9; 4 - AD494(DE3)pLysS, среда ЛБ.

длительности лаг-фазы роста при их облучении и культивировании в средах M9 и ЛБ за исключением варианта, когда штамм *E. coli* MC1061 был облучен дозой 7 кДж/м² ($P < 0.01$) и далее культивирован в среде M9 (значения длительности лаг-фазы у контроля и опыта были при этом 0.594 ± 0.255 ч и 3.87 ± 0.269 ч, соответственно). Диаграмма особенностей стимуляции удельной скорости роста штаммов *E. coli* в зависимости от дозы излучения представлена на рис. 2.

При облучении клеток *E. coli* MC1061 дозами 1, 5 и 7 кДж/м² ($P < 0.01$) (рост в среде М9), а также 3 ($P < 0.05$), 4 и 5 ($P < 0.01$) кДж/м² (рост в среде ЛБ) было зафиксировано увеличение урожая. Для штамма *E. coli* AD494(DE3)pLysS повышение урожая было обнаружено при действии доз 1, 4 - 9 кДж/м² ($P < 0.01$) (рост в среде М9), 3 ($P < 0.05$), 4, 5, 7 и 9 ($P < 0.01$) кДж/м² (рост в среде ЛБ).

Имеющиеся в литературе данные (Kagu *et al.*, 2001) позволяют предполагать, что обнаруженное в наших исследованиях отсутствие достоверных различий в длительности лаг-фазы между контрольными и опытными культурами может быть обусловлено стимуляцией адгезии клеток к стеклу. Полученные результаты (снижение, а также отсутствие стимуляции скорости роста при облучении дозами 7-10 кДж/м²) согласуются с опубликованными ранее данными (Тифлова, Кару, 1987; Voskanyan, 1990) об отсутствии чувствительности клеток *E. coli* к высоким дозам облучения. Различная реактивность клеток на свет (при одинаковых условиях облучения) позволяет предполагать, что генетические особенности штаммов *E. coli* могут играть существенную роль в ответных реакциях микроорганизмов на воздействие красного и инфракрасного света. При этом питательная среда может оказывать вторичное модифицирующее воздействие.

1.1. Влияние красного и инфракрасного света на рост клеток *E. coli*, синтезирующих рекомбинантный белок барстар

При исследовании влияния красного и инфракрасного света с дозой 4 кДж/м² были получены данные, свидетельствующие о стимуляции роста и биосинтеза рекомбинантного барстара клетками *E. coli* AD494(DE3)pLysS (табл. 1 и рис. 3).

Было обнаружено, что примененный вид излучения оказывал большее стимулирующее воздействие на рекомбинантные клетки, чем на облученные нерекомбинантные клетки. Однако жизнеспособность рекомбинантных клеток при этом оставалась пониженной.

Влияние красного и инфракрасного света на рост клеток *E. coli* AD494(DE3)pLysS в среде M9, подвергнутых трансформации (1), облучению (2), а также их совместному воздействию (3)

Параметр роста	Вариант опыта			
	Контроль	1	2	3
Удельная скорость роста, ч ⁻¹	0.26±0.012	0.12±0.082	0.3±0.059	0.21±0.044
Урожай, ед. ОП	0.67±0.037	0.21±0.098	0.77±0.039	0.46±0.064

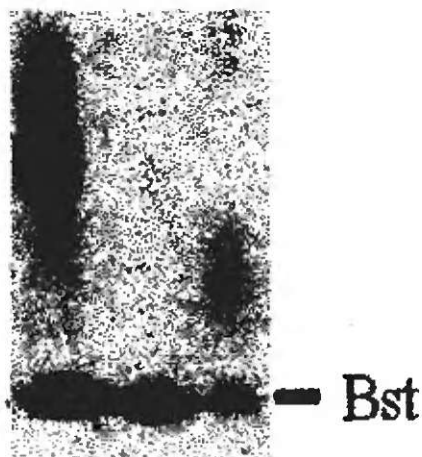


Рис. 3. Влияние красного и инфракрасного света на биосинтез барстара клетками *E. coli* AD494(DE3)pLysS. Линия 1 – барстар (Bst), выделенный из 1 мл облученной культуры с ОП₅₉₀ 1.0. Линия 2 – контроль (очищенный барстар в количестве 0.01 мг). Линия 3 – барстар, выделенный из 1 мл необлученной культуры с ОП₅₉₀ 1.0.

1 2 3

Причиной угнетения роста рекомбинантных (продуцирующих белок) клеток может быть экспрессия барстара, - чужеродного для *E. coli* белка. Влияние барстара на РНКазы *E. coli* не исследовано. Не исключено, что барстар, являющийся ингибитором бактериальных рибонуклеаз, подавляет работу РНКаз *E. coli*, влияя, соответственно, негативно и на рост бактерий.

1.2. Влияние обработки клеток *E. coli* хлористым кальцием на их чувствительность к красному и инфракрасному свету

Известно, что мембраны клеток принимают активное участие в акцепции света (Кагу, 1999). В связи с этим выяснение влияния эффекта кальциевой обработки, нарушающей целостность мембран клеток, представляло особый интерес. Клетки *E. coli* AD494(DE3)pLysS были облучены максимально стимулирующими дозами - 5 кДж/м² и 3 кДж/м² и культивированы в средах M9 и ЛБ, соответственно.

Из представленных в табл. 2 данных следует, что обработка клеток 50 мМ раствором CaCl_2 не отменяла стимулирующего воздействия красного и инфракрасного света на рост культуры. Однако эффект стимуляции роста в случае предварительной обработки клеток хлористым кальцием оказывался менее выраженным.

Таблица 2

Параметры роста клеток штамма *E. coli* AD494(DE3)pLysS при действии на них хлористого кальция и излучения

Вариант культуры	Параметры роста							
	Длительность лаг-фазы, ч		Удельная скорость роста, ч ⁻¹		Время удвоения, ч		Урожай, ед. ОП	
	М9	ЛБ	М9	ЛБ	М9	ЛБ	М9	ЛБ
Контроль	1.535	0.679	0.276	0.811	2.521	0.859	0.612	0.999
	± 0.491	± 0.095	± 0.019	± 0.068	± 0.181	± 0.067	± 0.029	± 0.018
Опыт	1.384	0.682	0.316	0.844	2.203	0.826	0.661	1.023
	± 0.32	± 0.202	± 0.021	± 0.078	± 0.149	± 0.071	± 0.014	± 0.028

Сравнительный анализ полученных результатов с ранее описанными данными позволяет выяснить степень снижения стимулирующего влияния красного и инфракрасного света на клетки *E. coli*, обработанные перед облучением хлористым кальцием. При культивировании клеток в среде М9 было обнаружено снижение стимуляции урожая с 20.59 ± 1.49 % до 8 ± 1.39 %. Стимуляция удельной скорости роста в среде М9 была снижена с 30.74 ± 3.57 % до 14.49 ± 3.38 %, а в среде ЛБ – с 7.47 ± 1.35 % до 4.07 ± 0.47 %.

Первичные механизмы действия ионов кальция на клетки в целом, и на плазматические мембраны в частности, пока не исследованы. Предполагается, что ионы кальция могут играть роль в нейтрализации отрицательных зарядов на клеточной поверхности (Leive, 1974), нарушать структуру поверхностных белков (Oishi M., 1977), приводить к активации фосфолипаз, влияя на мембранную проницаемость (Benzinger, 1978). Весьма вероятно, что структура клеточных

мембран, а, следовательно, и мембранная топология фотоакцепторных цитохромных комплексов *bd* и *bo*, играющих основную роль в акцепции света клетками *E. coli* (Афансьева и др., 1995), изменяется вследствие действия ионов кальция на клетки. С этим может быть связано снижение стимулирующего эффекта красного и инфракрасного света в случае предварительной обработки клеток хлористым кальцием. Точные механизмы описанных феноменов еще предстоит выяснить.

2. Дистантное влияние бактериальных культур *E. coli*

Для проверки предположения о возможности оптического дистантного влияния (ДВ) одной культуры бактерий на рост другой культуры были поставлены эксперименты с использованием клеток *E. coli* AD494(DE3)pLysS. Опыты были проведены с применением среды ЛБ и специальной установки для культивирования клеток «колба-в-колбе» (Николаев, 1992).

Было исследовано влияние культуры-излучателя с различной начальной оптической плотностью (ОП) (от 0.2 до 1.2 с интервалом в 0.2 опт. ед.; серии опытов 1-6, соответственно) на рост детекторной культуры с одинаковой исходной ОП (0.1).

Получены данные, свидетельствующие о различном характере влияния излучательной культуры в зависимости от ее оптической плотности. Так, в сериях 1 и 2 наблюдали сокращение длительности лаг-фазы детекторной культуры. Однако при дальнейшем росте излучательная культура начинала ингибировать детекторную культуру, что проявлялось в уменьшении скорости роста детектора и выхода урожая. В сериях опытов 3 - 6 излучательная культура изначально оказывала негативное влияние на детектор, приводя к удлинению лаг-фазы, снижению скорости роста и урожая.

Результаты по влиянию разновозрастных культур микроорганизмов друг на друга были описаны в работах (Wolf, Ras, 1931; Кулин, 1965). Относительно механизмов наблюдаемых явлений можно предположить, что взаимодействие

микроорганизмов может быть обусловлено передачей сигнала в видимом и (или) инфракрасном диапазоне света, а не только в УФ.

2.1. Дистантное влияние бактерий *E. coli* при обработке их рифампицином

Установление фактов, свидетельствующих, что культура-детектор обладает высокой чувствительностью к изменениям культуры-излучателя, в значительной степени определило интерес к реакциям клеток культуры-детектора на излучательную культуру в условиях воздействия на нее дополнительного стрессора. Опыты были проведены со штаммом бактерий *E. coli* MC1061 с использованием среды ЛБ и установки «колба-в-колбе». В качестве стрессора был использован антибиотик рифампицин в конечной концентрации 30 мкг/мл, который добавлялся в разные фазы роста культуры-излучателя.

Таблица 3

Дистантное влияние обработанной рифампицином излучательной культуры *E. coli* MC1061 на рост детекторной культуры

Параметр роста	Стадия роста излучателя, на которой к нему добавляли антибиотик								
	Лаг-стадия			Активный рост			Стац. стадия		
	И	Д	К	И	Д	К	И	Д	К
Длительность лаг-фазы, ч	-	0.482 ± 0.091	0.364 ± 0.121	0.313 ± 0.348	0.342 ± 0.258	0.292 ± 0.295	0.414 ± 0.202	0.311 ± 0.265	0.423 ± 0.318
Удельная скорость роста, ч ⁻¹	-	0.814 ± 0.056	0.799 ± 0.066	0.923 ± 0.124	0.808 ± 0.074	0.787 ± 0.038	0.797 ± 0.065	0.779 ± 0.062	0.777 ± 0.05
Время удвоения, ч	-	0.855 ± 0.06	0.873 ± 0.073	0.763 ± 0.098	0.864 ± 0.077	0.881 ± 0.042	0.875 ± 0.066	0.894 ± 0.071	0.895 ± 0.06
Урожай, ед.ОП	0.034 ± 0.025	1.202 ± 0.02	1.174 ± 0.022	0.295 ± 0.019	1.313 ± 0.039	1.181 ± 0.029	0.559 ± 0.052	1.035 ± 0.051	1.012 ± 0.035

Результаты опыта, представленные в табл. 3, свидетельствуют, что характер влияния культуры, обработанной антибиотиком, на рост другой

культуры зависит от того, на какой стадии роста излучательной культуры добавляется антибиотик.

В работах Николаева (1996а, 1996б) было показано, что в ответ на действие различных стрессоров клетки *E. coli* выделяют в окружающую среду соединения («фактор ускоренной адаптации к новой среде» и «ростовой замедлин»), оказывающие защитное действие и способствующие адаптации микроорганизмов к стрессам. Представляется вероятным, что при обработке клеток рифампицином в наших исследованиях излучательная культура тоже выделяла адаптогенные факторы. При этом сигналы, исходящие от культуры-излучателя, могут быть направлены на повышение устойчивости клеток детекторной культуры к антибиотику (возможность дистантной регуляции устойчивости бактерий к антибиотикам была продемонстрирована в работах (Matsuhashi *et al.*, 1996)), а также на усиление адгезии клеток к стеклу (с чем может быть связано увеличение длительности лаг-фазы культуры-детектора). Не исключено, что детекторная культура под влиянием обработанной антибиотиком излучательной культуры запускает собственные защитные механизмы (обуславливающие в том числе интенсификацию роста) на стадии, соответствующей концу ее активного роста (так как достоверных различий в скорости роста между детекторной и контрольной культурами на этом этапе не обнаружено). В этой связи повышение урожая у детекторной культуры может быть следствием «запоздлой» адаптации культуры к дистантно воспринимаемому экстремальному фактору.

Отсутствие различий удельной скорости роста в контроле и детекторной культуре может быть связано с запаздыванием реакции детекторной культуры на обработку антибиотиком излучательной культуры, находящейся, как и культура-детектор, в фазе активного роста. Дальнейшее влияние обработанной рифампицином культуры-излучателя возможно приводило к запуску ростостимулирующих механизмов, которые и обеспечивали повышение урожая культуры-детектора в среднем на 11.2 %. Отсутствие влияния культуры-излучателя, обра-

ботанной на стационарной фазе роста антибиотиком, на рост детекторной культуры может быть связано со слабой воспринимающей способностью детекторной культуры при ее вступлении в стационарную фазу роста (Николаев, 1992), или с неспособностью излучательной культуры посылать ростостимулирующие сигналы.

2.2. Дистантные взаимовлияния бактериальных культур *E. coli*

Поскольку в описанных ранее опытах количества детекторной и излучательной культуры отличались вследствие особенностей сосудов использованной установки, значительный интерес представляло выяснение характера взаимовлияния культур, выращиваемых в равных объемах питательной среды, а также занимающих одинаковое пространственное положение по отношению друг к другу.

Культуры бактерий *E. coli* MC1061 были выращены в средах ЛБ и М9 с использованием «УСС». Культура, растущая в одном отсеке, соответствует «культуре 1», а в соседнем отсеке установки, - «культуре 2». Также были проведены опыты, в которых аналоги отсеков «УСС» были обернуты черной бумагой (для оптической изоляции) и приставлены «дно-ко-дну».

Параметры роста культур, выращенных в «УСС», приведены в табл. 4.

Таблица 4

Параметры роста *E. coli* MC1061 при культивировании клеток в различных питательных средах в «УСС»

Параметр роста	Среда роста	Вариант культуры		
		Культура 1	Культура 2	Контроль
Длительность лаг-фазы, ч	ЛБ	0.274±0.295	0.366±0.148	0.345±0.171
	М9	0.899±0.151	0.871±0.229	0.643±0.238
Удельная скорость роста, ч ⁻¹	ЛБ	0.794±0.04	0.802±0.034	0.769±0.032
	М9	0.567±0.027	0.569±0.044	0.513±0.035
Время удвоения, ч	ЛБ	0.874±0.044	0.866±0.037	0.902±0.037
	М9	1.225±0.055	1.225±0.091	1.357±0.088
Урожай, ед. ОП	ЛБ	1.058±0.043	1.07±0.043	1.196±0.04
	М9	0.755±0.019	0.753±0.014	0.761±0.026

Отсутствие какого-либо взаимного влияния культур при использовании оптической изоляции позволяет предполагать, что информационный сигнал бактерий в данном случае имеет не звуковую природу, установленную ранее для бактерий *B. carboniphilus* и *B. subtilis* (Matsushashi *et al.*, 1995, 1996, 1997). Способность инфракрасного света быть переносчиком информационного сигнала была обнаружена при использовании в качестве объектов ЗТЗ клеток (Albrecht-Buehler, 1991), клеток ВНК (Albrecht-Buehler, 1992), клеток *Rhodospirillum rubrum* (Albrecht-Buehler, 1997) и клеток млекопитающих (Albrecht-Buehler, 2000). Вероятно, физической основой информационных сигналов для бактерий одновременно с видимым светом может также быть и инфракрасный свет.

2.3. Дистантные взаимовлияния двух культур *E. coli* при выращивании их в различных питательных средах

Для выявления особенностей взаимовлияния бактерий *E. coli* MC1061 при их культивировании в различных питательных средах была использована система «УСС», в одном отсеке которой культура выращивалась в среде М9, а в соседнем – в среде ЛБ. Для каждой культуры ставили свой контроль (то есть контрольные культуры бактерий выращивали в соответствующих средах; в соседнем отсеке при этом находилась стерильная среда).

Таблица 5

Дистантные взаимовлияния двух культур *E. coli* MC1061: параметры роста при одновременном культивировании клеток в различных питательных средах

Параметр роста	Среда роста			
	М9		ЛБ	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
Длительность лаг-фазы, ч	0.465±0.410	0.614±0.354	0.582±0.422	0.496±0.188
Время удвоения, ч	1.064±0.273	1.334±0.355	0.741±0.261	0.763±0.123
Удельная скорость роста, ч ⁻¹	0.691±0.173	0.545±0.107	1.012±0.241	0,926±0.130
Урожай, ед. ОП	0.617±0.053	0.678±0.049	1.768±0.206	1.219±0.083

Представленные в табл. 5 результаты свидетельствуют, что культуры бактерий способны оказывать взаимное влияние на рост друг друга. При этом особенности питательной среды и физиологического состояния культуры могут изменять характер этого влияния.

2.4. Дистантные взаимовлияния культур *E. coli* при предварительном облучении одной из них

Для проверки предположения об изменчивости характера дистантных взаимодействий микроорганизмов в случае предварительного облучения одной из культур красным и инфракрасным светом были проведены специальные исследования. Клетки *E. coli* MC1061 были облучены максимально стимулирующими дозами красного и инфракрасного света (6 кДж/м^2 и 5 кДж/м^2) и культивированы (в средах М9 и ЛБ, соответственно) с использованием «УСС». Результаты, приведенные в табл. 6, свидетельствуют о влиянии дистантного взаимодействия культур бактерий на характер стимуляции их роста при облучении красным и инфракрасным светом.

Таблица 6

Параметры роста взаимодействующих культур *E. coli* MC1061 при предварительном облучении одной из них красным и инфракрасным светом

Параметр роста	Среда роста	Вариант культуры		
		Контроль	Предварительно облученная	Детектор
Длительность лаг-фазы, ч	М9	0.664 ± 0.237	0.621 ± 0.194	0.587 ± 0.487
	ЛБ	0.474 ± 0.171	0.366 ± 0.258	0.661 ± 0.184
Удельная скорость роста, ч^{-1}	М9	0.549 ± 0.019	0.586 ± 0.021	0.579 ± 0.045
	ЛБ	0.804 ± 0.042	0.839 ± 0.051	0.936 ± 0.049
Время удвоения, ч	М9	1.264 ± 0.043	1.185 ± 0.043	1.205 ± 0.101
	ЛБ	0.864 ± 0.044	0.828 ± 0.049	0.741 ± 0.039
Урожай, ед. ОП	М9	0.755 ± 0.013	0.743 ± 0.016	0.735 ± 0.025
	ЛБ	1.101 ± 0.028	1.109 ± 0.018	1.104 ± 0.016

Для того, чтобы выяснить возможность вклада в эффект стимуляции бактериального роста светом культуры, растущей рядом с облученной, а также оп-

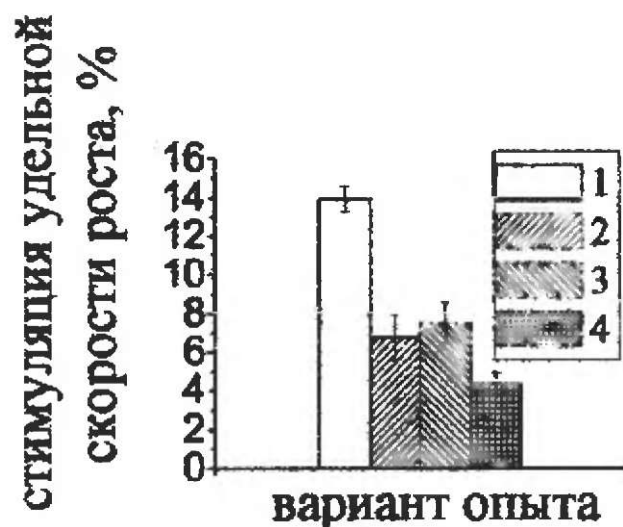


Рис. 4. Особенности стимуляции роста клеток *E. coli* MC1061 при облучении красным и инфракрасным светом в условиях дистантного взаимодействия культур. Цифрами обозначены: 1 - рост в среде М9 без ДВ; 2 - рост в среде М9 при ДВ; 3 - рост в среде ЛБ без ДВ; 4 - рост в среде ЛБ при ДВ.

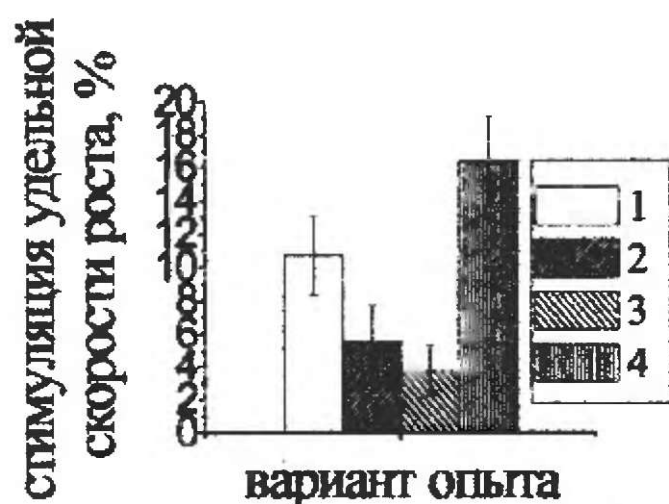


Рис. 5. Изменения характера дистантного взаимодействия культур *E. coli* MC1061 при предварительном облучении (ПО) одной из них красным и инфракрасным светом. Цифрами обозначены: 1 - рост в среде М9, ДВ; 2 - рост в среде М9, ДВ+ПО; 3 - рост в среде ЛБ, ДВ; 4 - рост в среде ЛБ, ДВ+ПО.

ределить наличие различий во взаимном влиянии культур без предварительного облучения одной из них и с предварительным облучением, был предпринят сравнительный анализ результатов настоящего эксперимента с ранее полученными данными (рис. 2). Результаты по стимуляции удельной скорости роста культур *E. coli*, подвергнутых воздействию максимально стимулирующих доз и культивированных при наличии (то есть в условиях дистантного взаимодействия (ДВ)) или в отсутствии рядом другой культуры, представлены на рис. 4.

Как следует из данных рис. 4, эффект стимуляции удельной скорости роста культур излучением красного и инфракрасного диапазона снижался, когда облученная культура выращивалась совместно с дру-

гой культурой (детектором).

Результаты сравнения опытов, описанных в главах 2.2. и 2.4., представленные на рис. 5, свидетельствуют, что в среде М9 эффект взаимной стимуляции роста двух культур также был ниже при предварительном облучении одной из них. Напротив, при росте в среде ЛБ эффект взаимной стимуляции роста был значительно выше в случае предварительного облучения одной из культур красным и инфракрасным светом.

Известно, что красное и инфракрасное излучение снижает уровень свободнорадикального окисления (Козлов, 1993), и, следовательно, уменьшает спонтанную хемилюминесценцию, что теоретически должно приводить к разрыву дистантной связи между бактериями. Однако обнаруженное в наших исследованиях дистантное взаимодействие между культурами, одна из которых была облучена красным и инфракрасным светом, позволяет предполагать, что в формировании канала связи взаимодействующих культур бактерий могут быть вовлечены различные процессы, механизмы которых еще предстоит выяснить.

Снижение эффекта стимуляции удельной скорости роста при облучении клеток красным и инфракрасным светом в условиях совместного выращивания с культурой-детектором могло быть обусловлено рядом причин. Известно, что свето-индуцируемая эмиссия имеет интенсивность на 2 порядка выше, чем спонтанная (Вайраі, 1998). В связи с этим можно предположить, что облученная культура являлась источником повышенной эмиссии света и его увеличенный поток мог восприниматься клетками детекторной культуры. С другой стороны, повышенная эмиссия света облученной культуры могла быть причиной снижения удельной скорости роста детекторной культуры при культивировании в среде М9. Противоположный эффект, наблюдающийся при использовании среды ЛБ (когда облученная культура оказывала большее стимулирующее действие на культуру-детектор, нежели предварительно не облученная культура), мог быть обусловлен поглощением «излишнего» света средой ЛБ. Однако так ли это, еще предстоит выяснить.

2.5. Регистрация излучений бактерий *E. coli*

Обнаружение дистантного взаимодействия бактериальных культур методом биологического детектирования привело к необходимости регистрации и анализа излучений исследуемых бактерий. Для этого был использован метод спектроскопии.

Клетки *E. coli* MC1061 были культивированы в средах М9 и ЛБ с использованием «УСС». Для анализа интенсивности излучения были отобраны пробы спустя 0.5, 2.5 и 5 часов после начала культивирования. Излучения бактериальных культур в отсутствие дистантных взаимодействий представлены на рис. 6 (а-е) и соответствуют обозначению “контроль”. Взаимодействующие культуры определены как «культура 1» и «культура 2».

Полученные результаты свидетельствуют о синхронизации интенсивности излучения микроорганизмов на всех фазах роста бактериальных культур при их совместном выращивании (как в среде М9, так и в среде ЛБ). Поскольку постановка данного опыта и условия культивирования клеток соответствовали таковым для эксперимента, описанного в главе 2.2., сопоставление полученных результатов представляет особый интерес.

Так, при культивировании клеток *E. coli* MC1061 в среде М9 с использованием «УСС» (глава 2.2) было обнаружено удлинение лаг-фазы (табл. 4) и снижение интенсивности излучения (рис. 6 а). При выращивании клеток в среде ЛБ не было обнаружено различий в длительности лаг-фазы между контролем и взаимодействующими культурами, а также не было выявлено и различий в интенсивности излучения микроорганизмов между контролем и взаимодействующими культурами (рис. 6 б).

При взаимодействии клеток *E. coli* MC1061 (рост на средах М9 и ЛБ в «УСС») было установлено увеличение удельной скорости роста бактериальных культур (табл. 4) и повышенная эмиссия света соответствующих микроорганизмов (рис. 6 в, г).

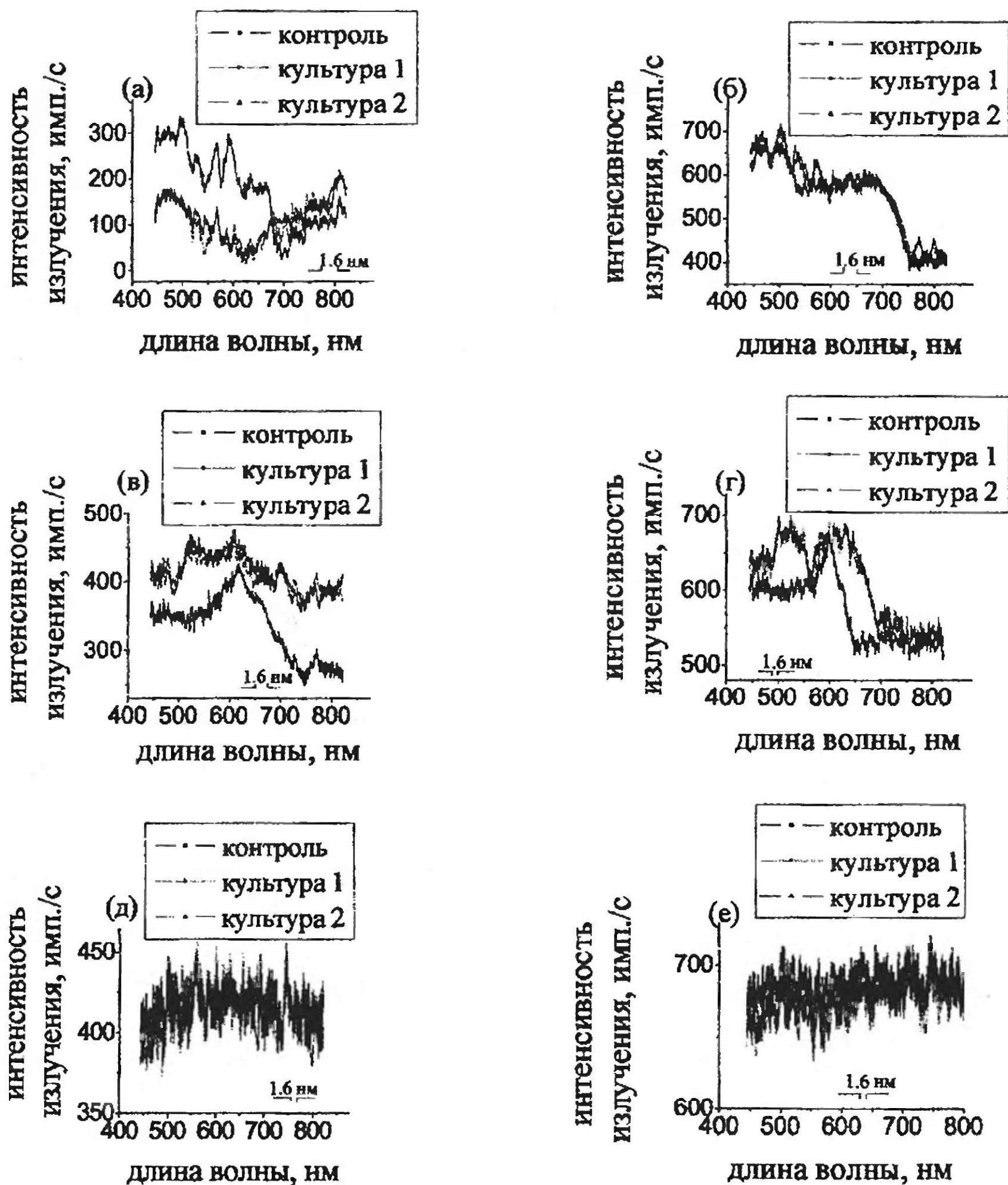


Рисунок 6. Спектральные распределения интенсивности излучения культур *E. coli* MC1061 при их дистантном взаимодействии: (а) лаг-фаза, рост в среде М9; (б) лаг-фаза, рост в среде ЛБ; (в) активный рост в среде М9; (г) активный рост в среде ЛБ; (д) стационарная фаза, рост в среде М9; (е) стационарная фаза, рост в среде ЛБ.

Изменения урожая взаимодействующих культур при выращивании в среде М9 не обнаружены. Также не выявлены и различия в интенсивности излучения культур на стационарной фазе роста (рис. 6 д). Напротив, при совместном выращивании культур в среде ЛБ было зафиксировано снижение их урожая (табл. 4), а также интенсивности их излучения по сравнению с контролем (рис. 6 е). Таким образом, между особенностями роста и излучения бактерий при взаимодействии культур была обнаружена согласованность.

Обнаруженный феномен зависимости роста и эмиссии света, а также ее синхронизации при взаимодействии культур, по-видимому, является универсальным, поскольку ранее аналогичные данные были получены как для растений (Будаговский, 2001), так и для животных (Белоусов, 2002).

ВЫВОДЫ

1. Одновременное воздействие на клетки *E. coli* AD494(DE3)pLysS и MC1061 красного и инфракрасного света в интервале доз 3-7 кДж/м² повышает удельную скорость роста и урожай бактериальных культур; стимулирующий эффект максимален при росте бактерий на синтетической питательной среде М9.
2. Ростостимулирующий эффект красного и инфракрасного света более выражен по отношению к штамму *E. coli* AD494(DE3)pLysS, несущему плазмиду с геном барстара по сравнению с нерекомбинантными штаммами *E. coli* AD494(DE3)pLysS и MC1061, что свидетельствует о вкладе генетических модификаций в фоточувствительность бактерий.
3. Предварительная обработка клеток *E. coli* AD494(DE3)pLysS раствором хлористого кальция резко снижает стимулирующий эффект облучения независимо от типа питательной среды.
4. Дистантное взаимодействие двух культур *E. coli* зарегистрировано по вариации параметров роста детекторной культуры в ответ на изменение физиологического состояния излучательной культуры, вызванное возрастом бактерий, их обработкой антибиотиком и облучением.

5. Для *E. coli* MC1061 зарегистрирована световая эмиссия в видимой и ближней инфракрасной области спектра, интенсивность которой возрастает с течением времени культивирования.
6. Впервые установлен феномен синхронизации излучения дистантно взаимодействующих бактериальных культур.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Trushin M.V., Yagodina L.O. The modification of biostimulating effect of IR laser radiation by genetic transformation / X International Laser Physics Workshop, Moscow, Russia.- 2001.-P.166.
2. Trushin M.V., Yagodina L.O., Chernov V.M., Fedotov V.D. Low intensity non-coherent red and infrared radiation as *E. coli* growth stimulation factor / International Crimean Seminar «Cosmos and biosphere. Physical fields in biology, ecology, medicine», Partenit, Ukraine.- 2001.-P.100.
3. Трушин М.В. Регуляция роста бактерий посредством дистантных взаимодействий / IV научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов республики Татарстан, Казань, Россия.-2001.-С.111.
4. Трушин М.В., Семина И.Г. Изменение параметров роста бактерий под влиянием дистантных взаимодействий / VI Конференция молодых ученых “Биология - наука 21 века”, Пущино, Россия.-2002.-С.61.
5. Trushin M.V., Syomina I.G., Chernov V.M. Distant interactions regulating bacterial growth // Reproduction Nutrition Development.-2002.-V.42 (Suppl. 1).-S.39.
6. Trushin M.V., Yagodina L.O., Chernov V.M. The modification of biostimulating effect of IR laser radiation by genetic transformation // Laser Physics.-2002.-V.12.-№ 4.-P.656–658.
7. Трушин М.В. Влияние красного и инфракрасного излучения на рост клеток *Escherichia coli* и продукцию рекомбинантного белка барстара // Микробиология.-2002.-Т.71.-№ 4.-С.452-454.

8. Трушин М.В. Дистанционное взаимодействие двух бактериальных популяций / VI Всероссийский популяционный семинар «Фундаментальные и прикладные проблемы популяционной биологии», Нижний Тагил, Россия.-2002.-С.176-177.
9. Trushin M.V. Natural light from bacteria - what can it tell us ? / III International Symposium «Mechanisms of low-level doses action», Moscow, Russia.-2002.-P.207.
10. Trushin M.V. Studies on distant regulation of bacterial growth and light emission // Microbiology.-2003.-V.149.-№2.-P.363-368.
11. Trushin M.V. Do bacterial cultures spread messages by emission of electromagnetic radiations ? // Annals of Microbiology.-2003.-V.53.-№1.-P.37-41.